

Rec'd PC7070 18 MAR 2005

**PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC AGENT FOR ALLERGIC DISEASE**

**Patent number:** JP2001233777  
**Publication date:** 2001-08-28  
**Inventor:** NISHISAKA FUKIKO; SONE TOSHIRO; CHIBA KATSUYOSHI; OWAKI MAKOTO; KIMURA KAZUMASA  
**Applicant:** YAKULT HONSHA KK  
**Classification:**  
**- international:** A61K31/732; A61P11/00; A61P11/02; A61P11/06; A61P17/00; A61P37/06; A61P37/08; A23L1/30  
**- european:**  
**Application number:** JP20000048594 20000225  
**Priority number(s):** JP20000048594 20000225

**Abstract of JP2001233777**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a daily usable prophylactic and therapeutic agent for allergic diseases having high safety. **SOLUTION:** This invention relates to a prophylactic and therapeutic agent for allergic diseases, IL-5 (interleukin-5) production-suppressing agent, IL-4 (interleukin-4) production-suppressing agent and IFN- $\gamma$  production-enhancing agent each containing a pectin having 20-70% esterification degree and 50,000-1,000,000 molecular weight and/or a salt thereof as an active ingredient.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-233777  
(P2001-233777A)

(43) 公開日 平成13年8月28日 (2001.8.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K 31/732		A 6 1 K 31/732	4 B 0 1 8
A 6 1 P 11/00		A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 6
11/02		11/02	
11/06		11/06	
17/00		17/00	
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-48594 (P2000-48594)	(71) 出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(22) 出願日	平成12年2月25日 (2000.2.25)	(72) 発明者	西坂 扶岐子 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		(72) 発明者	曾根 俊郎 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		(72) 発明者	千葉 勝由 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アレルギー性疾患予防・治療剤

(57) 【要約】

【目的】 安全性が高く、日常的に使用可能なアレルギー性疾患予防・治療剤を提供する。

【構成】 エステル化度が20~70%、及び分子量が5万~100万のペクチン、及び／又はその塩を有効成分とする、アレルギー性疾患予防・治療剤、I L-5 (インターロイキン-5) 産生抑制剤、I L-4 (インターロイキン-4) 産生抑制剤、及びI F N- $\gamma$ 産生増強剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エステル化度が20～70%であるペクチン、及び／又はその塩を有効成分とするアレルギー性疾患予防・治療剤。

【請求項2】 ペクチンの分子量が5万～100万である、請求項1記載のアレルギー性疾患予防・治療剤。

【請求項3】 ペクチンがIL-5（インターロイキン-5）産生抑制剤、IL-4（インターロイキン-4）産生抑制剤、及びIFN- $\gamma$ 産生増強剤である、請求項1及び2記載のアレルギー性疾患予防・治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アレルギー性疾患予防・治療剤に関し、更に詳しくは、エステル化度が20～70%、及び分子量が5万～100万のペクチン、及び／又はその塩を有効成分とするアレルギー性疾患予防・治療剤、IL-5（インターロイキン-5）産生抑制剤、IL-4（インターロイキン-4）産生抑制剤、及びIFN- $\gamma$ 産生増強剤に関する。

【0002】

【従来の技術】アレルギー性疾患は、IgEの関与する即時型反応と好酸球の関与する遅発型反応とが複雑に影響し合っている。この内IgEの産生は、IL-4を中心とする幾つかのサイトカインにより調節されている。すなわち、IgE産生はIL-4産生により引き起こされ、IL-4産生は、IFN- $\gamma$ の減少やIL-5産生により引き起こされる。これらIL-5及びIL-4は抗原特異的ヘルパーT細胞（Th-2）から産生され、IFN- $\gamma$ はTh-1から産生されることから、アレルギー性疾患はこれらサイトカイングループ間のバランスが崩れることによって引き起こされると考えられた。

【0003】このような知見から、IL-5及びIL-4産生を抑制し、且つIFN- $\gamma$ 産生を増強する物質は、各種アレルギー性疾患（気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、薬物アレルギー及び好酸球性肺炎等の好酸球増多症）に有効であると考えられる。

【0004】一方、種々のアレルギー性疾患にはステロイド性抗炎症剤が用いられ、その劇的な治療効果が認められてきた。しかし、ステロイド剤は多くの臓器が標的となり、紅斑の発生、色素沈着、発育不全等の重篤な副作用が問題となっている。また、使用を中止すると、症状が再発するという問題も挙げられている。

【0005】そこで、多くの非ステロイド性抗炎症剤、及び抗アレルギー剤が開発されてきた。又、植物エキスも多く報告があり、例えばヒマラヤユキノシタ属植物抽出物のヒアルロニダーゼ阻害効果（特開平11-209295）、甜茶のヒスタミン遊離抑制効果（「甜茶(rubus suavissimus)熱水抽出エキスの抗アレルギー作用」炎症、15(2)、p167-173、1995.）、及びウコン、タンジン等の抗体産生細胞の増殖抑制効果が報告されて

いる（特開平8-040922）。

【0006】これら非ステロイド性薬剤のうち、気管支喘息やアトピー性皮膚炎等に著効するものはほとんど存在しない。また、これらの効果の多くが非選択的な抗体産生細胞の増殖抑制効果、起炎物質の遊離阻害、或は起炎物質等の競合拮抗阻害等であり、これらの効果は、発症後の症状の緩和・治療には好適であっても、抗体産生の過剰抑制や、抗体反応の不必要な低減等が懸念され、発症の予防のために日常的に用いるには問題があった。このように、アレルギー性疾患の治療に用いられる現在の医薬品は、副作用、離脱の困難性、効果の面から必ずしも安心して用いられるものではない。また、投与を中止すると再発する疾患が多いことから、症状を改善する食品、飲料品、或は化粧品といった、日常的に使用可能な製品も望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、IL-5及びIL-4産生を抑制しIFN- $\gamma$ 産生を増強し、アレルギー性疾患の予防・治療に有効であり、且つ日常的に使用できる安全な素材を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】かかる事情を鑑み鋭意研究した結果、本発明者らは、ペクチンの内、エステル化度が20～70%であり、かつ分子量が5万～100万であるペクチンが、IL-5及びIL-4の産生を抑制し、IFN- $\gamma$ の産生を増強する事を見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明の請求項1に係る発明は、エステル化度が20～70%であるペクチン、その塩、及び／又はエステルを有効成分とするアレルギー性疾患予防・治療剤についての発明であり、請求項2に係る発明は、更にペクチンの分子量が5万～100万であるアレルギー性疾患予防・治療剤についての発明である。また、本発明の請求項3に係る発明は、前記アレルギー性疾患の予防・治療効果が、IL-5（インターロイキン-5）産生抑制効果、IL-4（インターロイキン-4）産生抑制効果、及びIFN- $\gamma$ 産生増強効果である、アレルギー性疾患予防・治療剤についての発明である。

【0010】

【発明の実施の形態】ペクチンとは、高等植物の細胞間に存在する多糖であり、その増粘性、吸水性、或は分散性向上効果が飲料や化粧品に、又創傷治癒等の効果が医薬品等に利用されている。

【0011】本発明で使用するペクチンは、天然成分から抽出したものであっても、合成によって製造されたものでも良く、そのエステル化度が20～70%、好ましくは20～50%のものであれば良い。このようなペクチンは、例えば天然ではレモン等の柑橘類や、リンゴ、

ヨモギ等から得ることができ、特にヨモギ、カワラヨモギ等キク科の植物のペクチンが好ましい。更に、分子量が5万～100万のものを使用する場合、本発明はより効果的である。

【0012】本発明素材は従来より食品等に使用されており、安全性が高く、従って剤形や投与量は任意に選定でき、食品、医薬品、化粧品などに添加、配合して用いることができる。本発明素材は単品、あるいは液状または固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を配合し、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の所望の剤型にすることができ、またガムやキャンディーのような口腔用組成物、水産練り製品、畜産製品、菓子類、麺類、調味料、清涼飲料水等一般的な飲食品の剤型とすることができる。あるいは界面活性剤、油分、アルコール類、保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、キレート剤、pH調整剤、香料、色素、ビタミン類、アミノ酸類、水等を配合してクリーム、軟膏、ローション、乳液、固形状、散剤など任意の剤型を有する外用剤として使用することができる。

【0013】本発明素材の成人1日当たりの好適投与量は、例えば経口投与であれば0.0001～20g、好ましくは0.001～10g、更に好ましくは0.1～5gが良い。また、外用であれば本発明素材を単独で用いても良く、あるいは0.001～50%含有させた組成物として用いる事もできる。本発明薬剤はそのまま外用、あるいは経口投与する他、任意の飲食物に添加して日常的に摂取させることもできる。

#### 【0014】

【実施例】以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0015】試験例1

##### 実験動物及び試験方法

6週齢BALB/C雄性マウスに、抗原であるオバルブミン(OA)20μgを2mgの水酸化アルミニウムアジュバンド(Alum)に吸着し、生理食塩水100μlに懸濁して、マウスの腹腔内に投与して免疫した。初回免疫から2週間後に同量のOA及びAlumで追加免疫し、更に1週間後に脾臓を摘出して単細胞浮遊液を調整した。これを10%FBSを含むRPMI1640培地を用いて、96穴マイクロプレート中でOA200μg/ml及び種々の被検物質と共に37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下にて培養した。培養開始から24時間後、1000rpmにて8分間遠心分離して培養上清を採取した。採取した培養上清中の種々のサイトカイン(IL-5、及びIFN-γ)をサンドイッチELISA法にて測定した。

#### 【0016】被検物質

エステル化度の異なるペクチンの、サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。試料として、GENUペクチン

(HM;エステル化度70%、LM22;エステル化度50%、LM12-1;エステル化度35%、コペンハーゲンペクチン社製)、ポリガラクトuron酸(エステル化度0%、シグマ社製)、ガラクトuron酸(エステル化度0%、シグマ社製)、及びカワラヨモギ由来ペクチン(エステル度約20%)を使用した。得られた結果を図1に示す。

【0017】図1の結果より、ペクチンはIL-5の産生を抑制し、IFN-γの産生を増強した。特に、LM22、LM12-1及びカワラヨモギ由来ペクチンの効果が高いことが明らかとなった。

#### 【0018】試験例2

試験例1に記載した方法にて、分子量の異なるペクチンの、サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。試料として、LM22、LM12-1を限外濾過およびゲル濾過により分子量10万～100万の画分と、5万～10万の画分に分離し、各々の効果を比較した。得られた結果を図2に示す。

【0019】図2の結果より、LM22、LM12-1何れのペクチンにおいてもIL-5の産生抑制効果は分子量10万～100万の画分に比べ、5万～10万の画分の方が高く、またIFN-γの産生増強効果は分子量10万～100万の画分が高いことが明らかとなった。

#### 【0020】試験例3

##### 実験動物及び試験方法

8週齢雌性BALB/cマウス(SLC)の両耳介皮膚の表裏に各25μlの0.15%2,4-ジニトロフルオロベンゼン(DNFB;アセトン:オリーブ油=3:1に溶解)を1週間に1度、合計5回塗布して皮膚反応を惹起した。薬物は抗原塗布日を含む週2回、すなわち抗原塗布1時間前および抗原塗布3日後に両耳介皮膚の表裏に25μlずつ塗布、または0.2mlずつゾンデを使用して経口投与した。各週毎に抗原塗布時、4時間後、24時間後の耳介の厚さをthickness gaugeを用いて測定した。

#### 【0021】被検物質

コントロール群は生理食塩水のみ、Dexamethasone 21-acetate(デキサメサゾン)およびペクチン(GENU LM12-1)は生理食塩水に懸濁し、経口投与の検体とした。また、ペクチン(GENU LM12-1)を70%アセトンに懸濁し、塗布検体とした。得られた結果を図3に示す。

【0022】図3より抗原を塗布したコントロール群は、抗原の代わりに溶媒を塗布した未感作群と比較し、2週間以降抗原塗布4時間、24時間後ともに明確な耳介浮腫が認められ、実験終了時には開始時に比較して耳介の厚さが約2倍にまで増加した。一方、ペクチン100mg/kg経口投与群は2週目以降、24時間後の浮腫を有意に抑制し、また4週目以降は4時間後の浮腫も抑制した。また、ペクチンは0.1mg/earを耳

介に塗布した場合でも有意に浮腫を抑制した。ステロイド性抗炎症薬のデキサメサゾン10mg/kgも浮腫を抑制した。

#### 【0023】試験例4

試験例3の動物について、血清中のIgE測定値を測定した。5回目の抗原塗布4時間後のマウスの血液から、3000rpm、10分間遠心分離して血清を採取し、総IgEおよび抗DNP-IgEをELISA法にて測定した。総IgEはELISA Kitを用いて測定した。抗DNP-IgEはHiranoら(J. Immuno. Methods, 119, 145-150, 1989.)およびSakaguchiら(J. Immuno. Methods, 116, 181-187, 1989.)の方法を改変して行った。すなわち、ラット抗マウスIgE抗体をディッシュにコートしたものに血清を加え、これにDNP-BSA(30)、ウサギ抗DNP-BSA、ALP標識したヤギ抗ウサギIgGを順に加え基質を発色させて測定した。得られた結果を図4に示す。

【0024】図4より血清中の総IgE産生に対し、ペクチンは経口投与により産生を有意に抑制した。その効果は抗原塗布を行わなかった未感作群と同程度で、ステロイド性抗炎症薬のデキサメサゾンよりも強いものだった。ペクチンの塗布ではデキサメサゾンと同程度のIgE産生を抑制する作用があることがわかった。一方、抗原特異的抗DNP-IgE産生量に対してはペクチンを投与した群は経口投与、塗布ともにコントロール群と比較して産生を抑制していた。

#### 【0025】試験例5

試験例3の動物について、耳介局所中のサイトカイン測定を行った。5回目の抗原塗布4時間後にマウスの左右両耳介を切除し重量を測定後、1mlのPBSを用いてポリトロンホモナイザー処理を行った。ホモジネート液にさらに投入式の超音波処理を行い、3000rpmで30分間遠心分離した。この上清中のサイトカインIFN- $\gamma$ 量をELISA Kitにて測定した。得られ

た結果を図5に示す。

【0026】図5より耳介ホモジネート上清中のIFN- $\gamma$ 産生量はコントロール群で極めて高値であり、耳介ではTh-1サイトカインが優位な状態であることが確認された。これに対し、ペクチン投与によりIFN- $\gamma$ 産生が抑制された。この効果は経口投与の方が塗布よりも強かった。以上のことから、ペクチン投与により、炎症局所ではTh-1サイトカインの過剰産生を抑制し、全身ではTh-2サイトカイン、IgE産生系を抑制し、結果としてサイトカイン産生のバランスを改善していることがわかった。

#### 【0027】

【発明の効果】本発明のアレルギー性疾患予防・治療剤は、IL-5の過剰な産生を抑制し、低減したIFN- $\gamma$ の産生を増強して生体のサイトカインのバランスを調節する効果を有し、またアレルギー性炎症の抑制効果、アレルギー性炎症における血清IgE産生の抑制効果を有しており、これを使用することにより、各種アレルギー性疾患(気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、ジンマシン、薬物アレルギー及び好酸球性肺炎等の好酸球増多症)の治療、或は発症の予防的治療が可能であり、且つ安全性が高く長期連続使用が可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】エステル化度の異なるペクチンの、サイトカイン産生に対する効果を示したものである。

【図2】分子量の異なるペクチンの、サイトカイン産生に対する効果を示したものである。

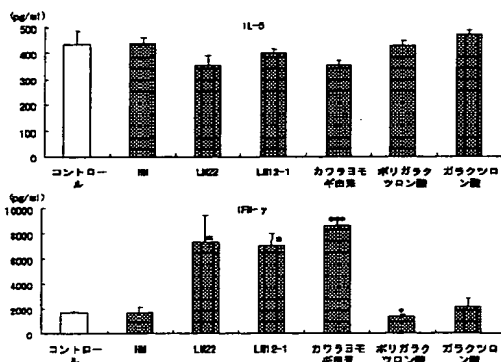
【図3】本発明品の、耳介浮腫の抑制効果を示したものである。

【図4】本発明品の、耳介浮腫モデルマウスの血清中IgE産生に対する効果を示したものである。

【図5】本発明品の、耳介浮腫モデルマウスの耳介局所IFN- $\gamma$ 産生に対する効果を示したものである。

【図1】

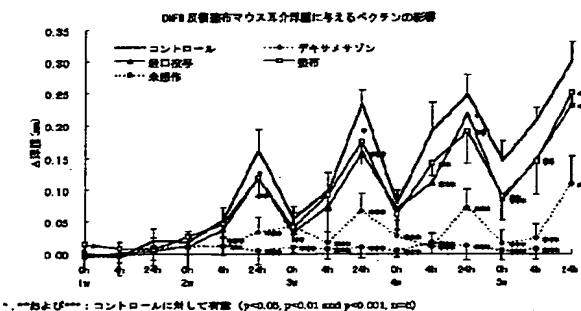
【図1】



\*, \*\* : コントロールに対して有意 (p<0.05, p<0.01, n=3)

【図3】

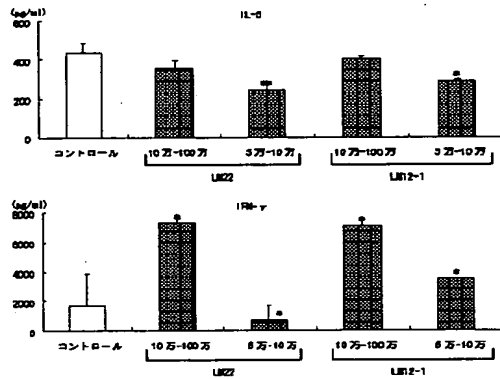
【図3】



\*, \*\*および\*\*\* : コントロールに対して有意 (p<0.05, p<0.01 and p<0.001, n=3)

【図2】

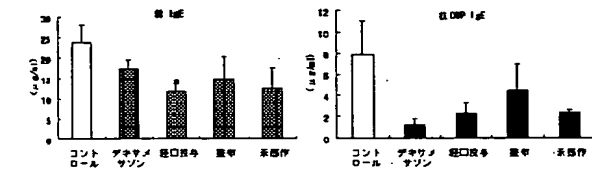
【図2】



\*、\*\* : コントロールに対して有意 (p&lt;0.05, p&lt;0.01, n=3)

【図4】

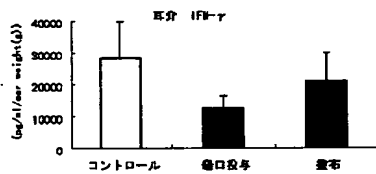
【図4】



\* : コントロールに対して有意 (p&lt;0.05, n=6)

【図5】

【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 37/06

37/08

37/08

// A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

Z

(72) 発明者 大脇 真

(72) 発明者 木村 一雅

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

Fターム (参考) 4B018 MD39 ME07 MF10

4C086 AA01 AA02 EA25 GA17 MA01

NA14 ZA34 ZA36 ZA59 ZA89

ZB03 ZB08 ZB13